

УДК 579.66

З.В. ЗАХАРОВ^{1,*}, Л.С. GERMAN¹, О.А. ПЕТРИЩЕВА¹, М.Ю. ЖАРКО¹, М.М. ВУСТИН²

¹ФГБОУ ВПО «Московский государственный машиностроительный университет» (МАМИ), Москва, 107023

²ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов» (ГосНИИгенетика), Москва, 117545

e-mail: zakharovdel@yandex.ru

Импульсный режим освещения дрожжей *Phaffia rhodozyma* в процессе биосинтеза астаксантина

Исследовано влияние постоянного и периодического освещения люминесцентными лампами на рост биомассы дрожжей *Phaffia rhodozyma* и биосинтез астаксантина при их периодическом культивировании в колбах. Определена оптимальная для выхода астаксантина освещенность при постоянном воздействии света — 200 лк. Установлено, что при превышении оптимального значения интенсивности света наблюдается ингибирование каротиногенеза у исследуемых дрожжей. Определен характер влияния импульсного воздействия света на накопление биомассы и продукцию каротиноидов клетками, выращенными на стандартной питательной среде, содержащей кристаллическую глюкозу, пептон и дрожжевой экстракт. Показано, что накопление каротиноидов на высоком уровне возможно при использовании импульсного режима освещения путем сокращения длительности светового воздействия и одновременно увеличения освещенности.

Ключевые слова: астаксантин, импульсный свет, индукция биосинтеза астаксантина, освещенность, *Phaffia rhodozyma*.

Дрожжи *Phaffia rhodozyma* — перспективный источник биологически ценных веществ, главным образом астаксантина, высшего каротиноида, сильнейшего из известных антиоксидантов. Астаксантин широко используется как природный пигмент для придания мясу рыб семейства лососевых естественного красного цвета [1, 2].

Чистый астаксантин активно применяется в косметике (защита от УФ лучей) и интенсивно внедряется в медицину для лечения и профилактики ряда заболеваний (глаукома, некоторые виды рака, сердечнососудистые заболевания и др.) [3–6].

Среди факторов, влияющих на биосинтез астаксантина клетками *Ph. rhodozyma*, одним из наиболее значимых является свет [7, 8]. Он вызывает образование в клетке различных форм свободных радикалов, включая синглетный кислород. Синтез астаксантина клетками *Ph. rhodozyma* осуществляется как защитный отклик на окислительный стресс, вызванный образованием в основном именно этого радикала [9].

Известно, что избыток световой энергии ингибирует биосинтез астаксантина и рост биомассы дрожжей *Ph. rhodozyma* [10]. В темноте накопление астаксантина клетками этих дрожжей су-

Захаров Захар Викторович, Герман Людмила Сергеевна, Петрищева Ольга Аркадьевна, Жарко Мария Юрьевна, Вустин Михаил Михайлович.

Список сокращений: КЖ — культуральная жидкость; СБМ — сухая биомасса; УФ — ультрафиолетовый; АХ — астаксантин.

* Автор для переписки.

щественно ниже, чем при постоянном освещении [11]. Одновременно с этим оптимальным для каротиногенеза является свет низкой интенсивности [12]. Из анализа литературных данных ясно, что оптимальная для биосинтеза астаксантина интенсивность постоянного света для разных штаммов дрожжей *Ph. rhodozyma* имеет различные значения [11, 13].

Распространенные на сегодня технологии культивирования дрожжей *Ph. rhodozyma* [14, 15], основанные на фотохимической индукции биосинтеза астаксантина, разработаны недостаточно, в частности, не определено время воздействия света на клетку, его интенсивность и периодичность освещения.

Наиболее обширные исследования по влиянию света на биосинтез АХ у дрожжей *Ph. rhodozyma* представлены в работе [13]. Наибольшее накопление астаксантина наблюдалось при освещенности в интервале от 350 лк до 7400 лк, создаваемой люминесцентной лампой холодной цветности. При освещенности более 7400 лк продукция астаксантина значительно снижалась. В свою очередь, накопление биомассы уменьшалось при постоянном увеличении интенсивности света.

В работе было также показано, что продуктивность по астаксантину прямо пропорциональна продолжительности освещения в течение суток. Максимальное накопление астаксантина наблюдалось при непрерывном освещении, в то время как сокращение продолжительности освещения до одного часа в сутки приводило к увеличению накопления биомассы по сравнению с таковым при постоянном освещении и снижению биосинтеза каротиноидов. Показано, что наиболее значимыми для освещения дрожжей являются первые двое суток культивирования, приходящиеся на экспоненциальную фазу роста. Проведен также эксперимент по влиянию 15-минутного однократного светового импульса с освещенностью 6000 лк на клетки дрожжей, которые были выращены в темноте в течение 2 сут. Продемонстрировано, что хотя, как было уже сказано, наибольший выход астаксантина наблюдался при непрерывном воздействии света на культуру, однократный 15-минутный световой импульс также способствовал некоторому увеличению синтеза целевого продукта. Его выход достигал максимума через 4 ч после начала импульса, а затем, к концу культивирования (через 24 часа после воздействия светом), общее накопление каротиноидов снижалось до значений контроля. Уровень накопления астаксантина при использовании однократного импульса оказался выше, чем в контроле при росте в темно-

те, но ниже, чем у варианта при постоянном освещении [13].

Данные по влиянию импульсного освещения на накопление астаксантина клетками *Ph. rhodozyma* представлены в патенте US20050124032 [16]. Авторы использовали импульсное освещение видимым белым люминесцентным или ближним УФ светом с периодичностью цикла свет—темнота 6/6, 12/12 и 24/24 ч/ч. Показано, что при периодическом освещении длительностью 6 ч ближним УФ светом происходит увеличение выхода АХ на 30% по сравнению с таковым при постоянном освещении белым светом.

Таким образом, литературные данные убедительно показывают зависимость накопления астаксантина клетками *Ph. rhodozyma* от продолжительности и интенсивности постоянного света, а также свидетельствуют о том, что во время темного периода биосинтез астаксантина также происходит, хотя и с меньшей интенсивностью. Кроме того, продемонстрировано, что желателно, чтобы световое воздействие осуществлялось в течение всего процесса культивирования. В то же время, эффект импульсного освещения на указанный процесс, его продолжительности и периодичности цикла свет—темнота остаются недостаточно изученными.

Целью данного исследования являлось определение экспериментальным путем зависимости биосинтеза астаксантина и роста биомассы дрожжей *Ph. rhodozyma* штамма ВКПМ У-2228 от интенсивности как импульсного, так и постоянного освещения.

УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

Объектом исследования служил мутантный штамм дрожжей *Phaffia rhodozyma* ВКПМ У-2228, полученный из штамма дикого типа ВКПМ У-989 в результате нескольких циклов мутагенеза с помощью нитрозогуанидина и последующего отбора более продуктивных по биосинтезу каротиноидов штаммов.

Освещенность обеспечивали компактными люминесцентными лампами фирмы Camelion (Китай) белой цветности мощностью 11 Вт, 26 или 75 Вт. Периодическое включение/выключение ламп осуществлялось с использованием механического суточного таймера (REV Ritter, Германия). Освещенность измеряли люксметром—УФ-радиометром ТКА-01/3 (Санкт-Петербург) и варьировали от 50 до 6400 лк путем изменения расстояния от источника света до поверхности колб и/или частичного закрытия лампы алюминиевой фольгой.

Посевной материал получали путем смыва трехсуточной культуры дрожжей, выращенной в пробирке на агаризованной полной дрожжевой среде, содержащей глюкозу, пептон и дрожжевой экстракт соответственно в количестве 2,0%, 1,0% и 0,5%. Смыв осуществляли с помощью посевной питательной среды (100 мл на 2 пробирки, состав среды см. ниже для каждого из двух экспериментов). По 20 мл полученной суспензии вносили в каждую колбу объемом 250 мл. Культивирование проводили на качалке фирмы New Brunswick Scientific при частоте вращения 300 об/мин в течение 42 ч при $(20 \pm 0,1)^\circ$.

Полученный посевной материал (2 мл) вносили в колбы емкостью 250 мл, содержащие 20 мл ферментационной среды, и выращивали в течение последующих 120 ч при температуре и частоте вращения качалки, указанных выше для культивирования посевного материала.

Начальный pH посевной и ферментационной сред был равен $4,5 \pm 0,05$ и создавался внесением 1,25%-ной серной кислоты.

В первом эксперименте (по определению оптимальной освещенности в колбах при постоянном освещении) для культивирования дрожжей *Ph. rhodozyma* использовали посевную и ферментационную среды, состав которых описан в [17] и которые содержали ферментализат крахмала (полученный дроблением некондиционного зерна с последующим разделением на фракции [18]) и кукурузный экстракт («Каргилл», Россия).

Во втором эксперименте (по влиянию освещенности и длительности воздействия света при постоянном и импульсном освещении) использовали стандартную питательную среду, содержащую кристаллическую глюкозу, пептон и дрожжевой экстракт (все компоненты производства Merck, Германия). Начальное содержание кристаллической глюкозы, пептона и дрожжевого экстракта в посевной среде составляло соответственно 2,0%, 0,325% и 0,2%, в ферментационной среде — соответственно 11,0%, 0,65% и 0,2%. Данная высокая начальная концентрация глюкозы в ферментационной среде не ингибирует рост клеток и синтез АХ, так как у штамма *Ph. rhodozyma* ВКПМ Y-2228 путем мутагенеза устранена чувствительность синтеза АХ и роста культуры к высокой концентрации глюкозы. Влияние состава и способа подачи дополнительной питательной среды на рост клеток и синтез АХ исключали путем ведения процесса в периодическом режиме при концентрации глюкозы в ферментационной среде, обеспечивающей отсутствие лимитирования основным субстратом.

Концентрацию глюкозы определяли по модифицированной методике Бертрана-Шоорля [19].

Астаксантин и сумму каротиноидов определяли по методикам, описанным в [20] и [21], соответственно.

Контроль стерильности питательных сред проводили методом посева тестируемой пробы на твердую богатую питательную среду для провокации роста микроорганизмов [22].

Сухую биомассу определяли в пробах объемом 1,0 мл в пробирках Эппендорфа после предварительного отделения биомассы центрифугированием, однократной промывки дистиллированной водой и последующей сушки до постоянной массы при температуре $(105,0 \pm 0,2)^\circ$. Взвешивание образцов проводили на аналитических весах (Kern, Германия).

В статье представлены средние значения параллельных экспериментов, проведенных в трех повторностях с анализом проб из двух колб на одну точку. Ошибку измерения определяли как рекомендовано в [23].

Уменьшение объема КЖ за счет выпаривания через 5 сут культивирования составляло 13—15% от исходного объема. При определении абсолютных и удельных величин содержания биомассы, каротиноидов и астаксантина эта величина не учитывалось, так как она была практически одинакова для всех сравниваемых проб, в то время как объем проб различался не более, чем на 3%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение оптимальной освещенности в течение ферментации в колбах при постоянном освещении

Изучали влияние различной освещенности (50 лк, 100, 200, 400 и 800 лк) на биосинтез астаксантина в течение 120 ч культивирования в колбах на качалке (рис. 1). Контрольные колбы находились в полной темноте.

Видно, что максимальный удельный выход астаксантина наблюдался при освещенности 200 лк (1,61 мг/г СБМ). При увеличении или уменьшении освещенности относительно этого значения происходило заметное ингибирование каротиногенеза. Самый низкий уровень синтеза АХ отмечался в темноте и при освещенности 800 лк (1,34 и 1,35 мг/г СБМ, соответственно).

Разница в выходе биомассы между вариантами при различных значениях освещенности оказалась незначительной ($\pm 0,7$ г/л), меньше ошибки

измерения. Средний выход биомассы составил 25,5 г/л.

Влияние освещенности и длительности воздействия света при постоянном и импульсном освещении на биосинтез каротиноидов

Импульсный способ подачи световой энергии может иметь практическое значение для синтеза астаксантина в связи с тем, что такой режим позволяет экономить электроэнергию и может быть масштабирован до промышленных объемов производства.

В экспериментах варьировали освещенность при двух способах подачи света: постоянном и импульсном.

В данной статье введено понятие «средняя освещенность за цикл» (сокращенно «лк/цикл»). Этот параметр рассматривается как освещенность (в люксах), заданная исследователем и «распределенная» по всей длительности цикла свет—темнота. Например, если культура клеток подвергается воздействию импульсного света освещенностью 1600 лк в течение 30 мин за цикл длительностью 4 ч (т.е. длительность темнового периода составляет 3 часа 30 мин), то средняя освещенность за цикл определяется следующим образом: $1600 \text{ лк} \cdot (30 \text{ мин}/4 \text{ ч}) = 200 \text{ лк/цикл}$. Для постоянного света при освещенности, например, 200 лк, эта величина фактически составляет $200 \text{ лк} \cdot (4 \text{ ч}/4 \text{ ч}) = 200 \text{ лк/цикл}$.

Импульсный свет задавали таким образом, что длительность цикла свет—темнота (4 ч), а также длительность светового импульса в этом цикле (30 мин) оставались неизменными в течение всего процесса культивирования, а варьировалась только интенсивность светового воздействия для достижения желаемых значений «средней освещенности за цикл»: 200 лк/цикл ($1600 \text{ лк} \cdot 30 \text{ мин}/4 \text{ ч}$) и 800 лк/цикл ($6400 \text{ лк} \cdot 30 \text{ мин}/4 \text{ ч}$).

Освещенность при постоянном воздействии света составляла 200 лк и 800 лк.

Контрольные колбы находились в темноте.

На рис. 2—4 представлены результаты пятисуточного культивирования исследуемого штамма дрожжей *Ph. rhodozyma* при различных режимах освещения.

Анализ результатов эксперимента показывает, что к концу процесса культивирования количество накопленной биомассы в темноте оказалось больше, чем при воздействии света — 16,3 г СБМ/л, причем импульсное освещение было ме-

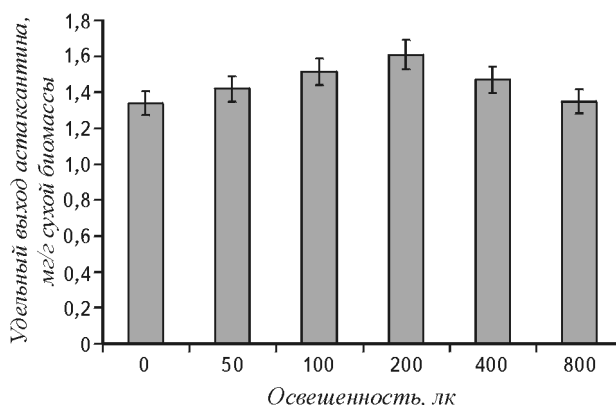


Рис. 1. Выход астаксантина во время культивирования дрожжей *Ph. rhodozyma* в колбах на качалке при различной освещенности

нее эффективным, чем постоянное (см. рис. 2). Это может объясняться тем, что рост освещенности, даже непродолжительный, приводит к заметному снижению накопления биомассы за счет усиления образования внутриклеточных свободных радикалов и, как следствие, к гибели части растущих клеток.

При рассмотрении динамики потребления глюкозы (см. рис. 3) хорошо видно, что рост биомассы четко коррелирует с потреблением сахара во времени. При этом в контроле и при постоянной освещенности (200 лк и 800 лк) количество остаточной глюкозы в КЖ на момент окончания процесса было наименьшим — 2,7—3,3% (см. рис. 3).

Для вариантов с импульсным светом через 2 дня культивирования биомасса достигала определенной концентрации, которая в дальнейшем практически не изменялась. К концу куль-

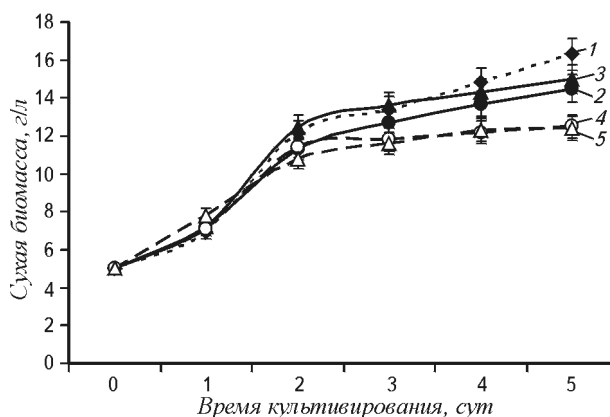


Рис. 2. Динамика накопления биомассы *Ph. rhodozyma* ВКПМ Y-2228 при различных способах освещения: постоянном при освещенности 200 лк (2) и 800 лк (3); и импульсном при средней освещенности за цикл 200 лк/цикл (4) и 800 лк/цикл (5). 1 — контроль (0 лк)

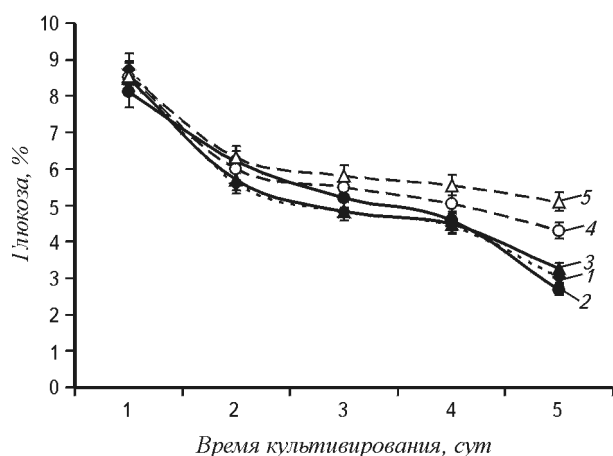


Рис. 3. Динамика потребления глюкозы дрожжами *Ph. rhodozyma* ВКПМ Y-2228 при различных способах освещения: постоянном при освещенности 200 лк (2) и 800 лк (3); и импульсном при средней освещенности за цикл 200 лк/цикл (4) и 800 лк/цикл (5). 1 — контроль (0 лк)

тивирования при импульсном воздействии, равном 200 лк/цикл и 800 лк/цикл, количество глюкозы составляло 4,3% и 5,1% соответственно (см. рис. 2 и рис. 3).

Динамика синтеза каротиноидов представлена на рис. 4. При постоянном воздействии света освещенностью 200 лк и периодическом со средней освещенностью 200 лк/цикл наблюдается наибольший удельный выход каротиноидов: 1,21 мг/г СБМ и 1,23 мг/г СБМ, соответственно. При импульсном воздействии, равном 800 лк/цикл, удельный выход каротиноидов оказался меньше, чем при 200 лк, но больше, чем при постоянном воздействии в 800 лк: 1,10 мг/г СБМ и 1,00 мг/г СБМ,

соответственно. Наименьший удельный выход каротиноидов наблюдался в темноте — 0,83 мг/г СБМ (см. рис. 4, а).

При анализе накопления каротиноидов в КЖ (см. рис. 4, б) картина была несколько иной: максимальный выход наблюдался при постоянной освещенности 200 лк (17,5 мг/л). При импульсном воздействии 200 лк/цикл выход из КЖ составил 15,4 мг/л, при постоянном воздействии светом и освещенности 800 лк — 14,9 мг/л, а при импульсном воздействии 800 лк/цикл — 13,7 мг/л. В темноте съём каротиноидов составил 13,5 мг/л (см. рис. 4, б).

Начиная с первой пробы, взятой в конце первых суток культивирования, концентрация клеток составляла 310 млн/мл и далее варьировала в пределах доверительного интервала независимо от времени культивирования и освещенности. Таким образом, различные способы подачи света не оказывали существенного влияния на титр клеток в течение всего процесса.

Таким образом, в результате исследования показано, что максимальный выход астаксантина при культивировании штамма Y-2228 дрожжей *Phaffia rhodozyma* в колбах наблюдался при воздействии постоянного света и освещенности 200 лк. Различный уровень освещенности при постоянном воздействии света не повлиял на итоговое накопление биомассы в результате культивирования на питательной среде, содержащей кукурузный экстракт и ферментоллизат крахмала.

Установлено, что при импульсном (периодическом) способе освещения культуры (цикл свет—темнота продолжительностью 4 ч) синтез каротиноидов удастся поддерживать на высоком уровне. В этом случае сокращение длительности

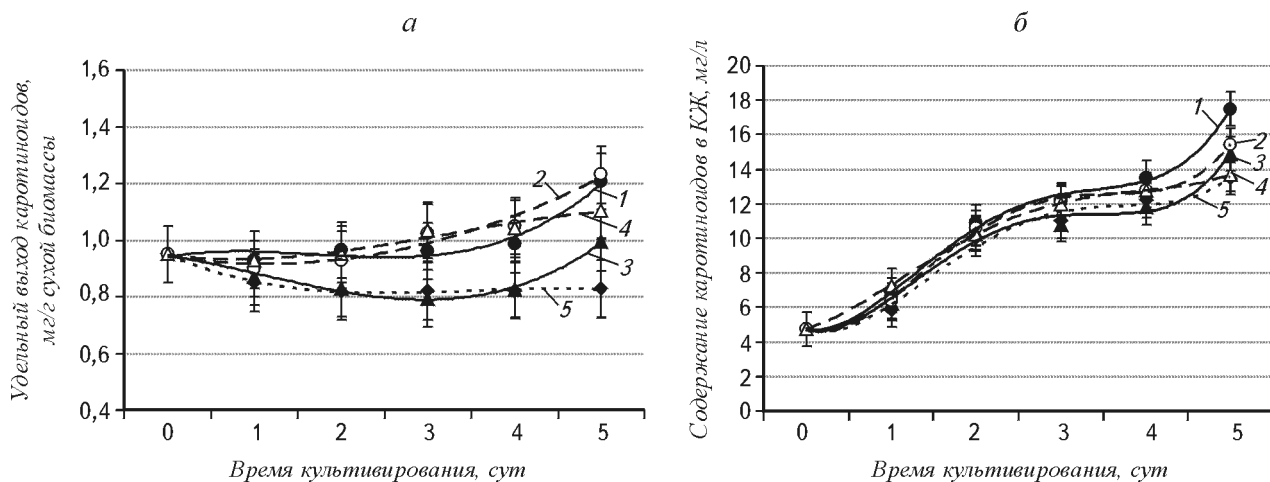


Рис. 4. Удельный выход каротиноидов от биомассы *Ph. rhodozyma* ВКПМ Y-2228 (а) и их содержание в КЖ (б) при различных способах освещения: постоянном при освещенности 200 лк (1) и 800 лк (3); и импульсном при средней освещенности за цикл 200 лк/цикл (2) и 800 лк/цикл (4). 5 — контроль (0 лк)

светового воздействия (в пределах цикла свет—темнота) необходимо восполнить пропорциональным увеличением интенсивности света.

Фотозащитный механизм в клетках, подвергшихся стрессовому эффекту свободных радикалов (синглетного кислорода), образованных под действием светового импульса, функционирует в течение нескольких часов после прекращения стрессового воздействия, что, по-видимому, приводит к ответной реакции клеток дрожжей *Ph. rhodozyma* в виде синтеза каротиноидов.

Интенсивность света (200 лк и 800 лк), а также способ подачи света (постоянный или импульсный) не оказывали заметного влияния на скорость размножения клеток — титр в течение всего процесса начиная с 24-го часа культивирования оставался на постоянном уровне.

Итогом работы можно считать экспериментальное подтверждение возможности использовать импульсное освещение при культивировании продуцента АХ *Ph. rhodozyma* ВКПМ У-2228. Сокращение времени освещения (наличие темновой части цикла) должно компенсироваться увеличением интенсивности световой части таким образом, чтобы среднее освещение за цикл оставалось оптимальным для данного штамма.

Таким образом, созданы предпосылки для возможного использования в промышленном масштабе выносного осветительного контура, что устраняет необходимость в специальном ферментационном оборудовании больших объемов с вмонтированными осветительными приборами для фото-зависимых процессов.

Получено 10.12.15

ЛИТЕРАТУРА

- Roy, S. Biotechnological potential of *Phaffia rhodozyma* / S. Roy, S. Chatterjee, S. K. Sen // J. Appl. Biosci. — 2008. — V. 5. — P. 115—122.
- Johnson, E.A. *Phaffia rhodozyma* as an astaxanthin source in salmonid diets / E. A. Johnson, T. G. Villa, M. J. Lewis // Aquaculture. — 1980. — V. 20(2). — P. 123—134.
- Cort, A. Suppressive effect of astaxanthin on retinal injury induced by elevated intraocular pressure / A. Cort, N. Ozturk, D. Akpinar, M. Unal, G. Yucel, A. Ciftcioglu, P. Yargicoglu, M. Aslan // Regulat. Toxicol. Pharmacol. — 2010. — V. 58. — P. 121—130.
- Kurihara, H. Contribution of the anti oxidative property of astaxanthin to its protective effect on the promotion of cancer metastasis in mice treated with resistant stress / H. Kurihara, H. Koda, S. Asami, Y. Kiso, T. Tanaka // Life Sci. — 2002. — V. 70(21). — P. 2509—2520.
- Jyonouchi, H. Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action / H. Jyonouchi, S. Sun, K. Iijima, M.D. Gross // Nutrit. Cancer. — 2000. — V. 36(1). — P. 59—65.
- Guerin, M. Haematococcus astaxanthin: applications for human health and nutrition / M. Guerin, M.E. Huntley, M. Olai-zola // Trends Biotechnol. — 2003. — V. 21(5). — P. 210—216.
- Frengova, G.I. Carotenoids from *Rhodotorula* and *Phaffia*: yeasts of biotechnological importance / G.I. Frengova, D.M. Beshkova // J. Ind. Microbiol. Biotechnol. — 2009. — V. 36(2). — P. 163—180.
- Захаров З.В. Культивирование *Phaffia rhodozyma* при постоянном и периодическом освещении / З.В. Захаров, Л.С. Герман, О.А. Петрищева, М.Ю. Жарко // Изв. Моск. гос. техн. ун-та МАМИ. — 2012. — Т. 4(2). — С. 86—89.
- Schroeder, W.A. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffia rhodozyma* / W.A. Schroeder, E.A. Johnson // J. Gen. Microbiol. — 1993. — V. 139(5). — P. 907—912.
- An, G.-H. Influence of light on growth and pigmentation of the yeast *Phaffia rhodozyma* / G.-H. An, E.A. Johnson // Antonie Van Leeuwenhoek. — 1990. — V. 57. — P. 91—103.
- Vazquez, M. Effect of the light on carotenoid profiles on *Xanthophyllomyces dendrorhous* strains (formerly *Phaffia rhodozyma*) // Food Technol. Biotechnol. — 2001. — V. 39(2). — P. 123—128.
- Schmidt, I. Biotechnological production of astaxanthin with *Phaffia rhodozyma* (*Xanthophyllomyces dendrorhous*) / I. Schmidt, H. Schewe, S. Gassel, C. Jin, J. Buckingham, M. Hümbelin, G. Sandmann, J. Schrader // Appl. Microbiol. Biotechnol. — 2011. — V. 89(3). — P. 555—571.
- Meyer, P.S. Photo-Regulated Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* Mutants / P.S. Meyer, J.C. Du Preez // System. Appl. Microbiol. — 1994. — V. 17(1). — P. 24—31.
- Jacobson, G. K., Jolly, S. O., Sedmak, J. J., Skatrud, T. J., Wasileski, J. M. Astaxanthin over-producing strains of *Phaffia rhodozyma*, methods for their cultivation, and their use in animal feeds // US Patent N 6413736 B1, C 12 P 23/00. 2002.
- Hoshino, T., Setoguchi, Y., Takagi, Y. Astaxanthin production using fed-batch fermentation process by *Phaffia rhodozyma* // US Patent № 7432076 B2, C 12 P 23/00. 2008.
- De La Fuente Moreno, J. L., Cezon, E.P., Garcia, B.D., Marcos Rodriguez, A.T., Sanchez, C.S., Saiz, M.R., Otero, C.R., Cabri, W., Barredo Fuente, J.L. Method of production of astaxanthin by fermenting selected strains of *Xanthophyllomyces dendrorhous* // US Patent N 20050124032, C 12 P 23/00. 2005.
- Герман Л.С., Вустин М.М., Жаворонков В.А., Захаров З.В., Каменев Е.А. Способ культивирования дрожжей *Phaffia rhodozyma* для получения кормовой добавки, содержащей астаксантин // Патент РФ № 2529715, C 12 N 1/16 (C 12 M1/00, A 23 K1/00). 2014.
- Герман Л.С., Метальникова Н.В., Сенаторова В.Н., Бирюков В.В., Щелькин И.Н., Федотова Н.В., Пасхин А.В. Способ переработки крахмалсодержащего растительного сырья для приготовления компонентов ферментационных сред, используемых в микробиологической промышленности при культивировании микроорганизмов // Патент РФ № 2410419, C 12 N 1/18 (C 12 P13/04). 2011.
- Колесников А.Л. Технический анализ продуктов органического синтеза. — М.: Высшая школа, 1966. — 232 с.

20. Зубов Д.В. Повышение точности количественного анализа культуральной жидкости на содержание нестойких компонентов с помощью тонкослойной хроматографии / Д.В. Зубов, Н.М. Солтанлы // Изв. МГТУ «МАМИ». — 2013. — Т. 2. — № 3(17). — С. 223—226.
21. An, G.-H. Isolation of *Phaffia rhodozyma* mutants with increased astaxanthin content / G.-H. An, D.B. Schuman, E.A. Johnson // Appl. Environ. Microbiol. — 1989. — V. 55(1). — P. 116—124.
22. Методы контроля бактериологических питательных сред: Методические указания. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2008. — 67 с.
23. Максимов В.Н. Многофакторный эксперимент в биологии. — М.: Изд-во МГУ, 1980. — 280 с.

Z.V. ZAKHAROV^{1,*}, L.S. GERMAN¹,
O.A. PETRISHCHEVA¹, M.Yu. ZHARKO¹,
and M.M. VUSTIN²

¹The Moscow State University of Mechanical Engineering (MAMI), 107023, Moscow Russia

²The State Research Institute for Genetics and Selection of Industrial Microorganisms (GosNIIGenetika), 117545, Moscow Russia

e-mail: zakharovdel@yandex.ru

Pulse Illumination of *Phaffia rhodozyma* Yeast during Astaxanthin Biosynthesis

The influence of the continuous and pulse luminescent illumination on *Phaffia rhodozyma* yeast growth and astaxanthin biosynthesis during the batch process in flasks has been studied. The optimal continuous illumination for the astaxanthin yield was established. The light excess over the optimum value was shown to inhibit the carotenogenesis in the yeasts. The character of the effect of the pulse illumination on the biomass growth and astaxanthin production during cell cultivation on a standard medium containing crystalline glucose, peptone and yeast extract was investigated. The results showed that the high astaxanthin accumulation is attainable using the combination of simultaneous reducing of light duration and increasing illumination.

Key words: astaxanthin, astaxanthin biosynthesis induction, illumination, *Phaffia rhodozyma*, pulse light.

* Author for correspondence.